

[文章编号] 1007-385X(2008)03-0296-05

· 综述 ·

RASSF1A 基因甲基化作为肿瘤生物学标志的临床应用

RASSF1A methylation as a tumor marker in clinical application: recent progress

胡佳乐, 陈 云 (中国人民解放军第 411 医院, 上海, 200081)

[摘 要] RAS 相关区域家族 1A 基因(ras-association domain family 1A, RASSF1A)是新近发现的一个位于人染色体 3p21.3 上的抑癌基因。RASSF1 表达的缺失是人类恶性肿瘤中最常见的一个分子事件,目前至少有 37 种肿瘤存在该基因启动子的甲基化。RASSF1 基因启动子 CpG 岛的甲基化在许多肿瘤组织和肿瘤患者体液中检测到,而在正常组织和体液中罕见,提示它具有肿瘤标志物的特征;RASSF1 与其他一些基因组合的甲基化分析有助于卵巢癌、乳腺癌、膀胱癌、肾癌、肺癌等的早期诊断。其次,RASSF1 甲基化可作为恶变危险因素的监测,良性增生性病变 RASSF1A 甲基化的出现往往提示恶变的危险性增高。第三,应用于预后判断,因为某些恶性肿瘤 RASSF1A 甲基化与患者预后不良相关联。第四,RASSF1A 甲基化提供了顺铂和三苯氧胺治疗是否耐药的一个标志,并可在癌症患者整个治疗过程给予监控。总之,RASSF1A 甲基化作为肿瘤生物标志物在肿瘤的诊断及其他众多领域有一定的临床应用前景。

[关键词] RAS 相关区域家族 1A 基因(RASSF1A);甲基化;肿瘤;诊断;耐药

[中图分类号] R730.2; R730.4 [文献标志码] A

近年越来越多的研究显示,人类肿瘤的发生、发展与 DNA 甲基化的异常修饰有关,而且早在肿瘤临床确诊之前就可检测出特异基因的甲基化异常现象。DNA 甲基化分析的优点之一在于它不仅适用于肿瘤组织,也适用于许多体液检查。RAS 相关区域家族 1A 基因(ras-association domain family 1A, RASSF1A)启动子的甲基化是人类肿瘤最常见的遗传学失活事件,对于癌症的早期发现是一个有用的标志物,为当今的研究热点,现综述其相关的临床应用研究进展^[1]。

1 RASSF1A 的生物学功能

已有研究表明^[1],3p 染色体的等位基因缺失在恶性肿瘤中出现频繁。Sekido 等^[2]在对肺癌及乳腺癌细胞系的研究中发现,该缺失区为位于 3p21.3 的一个 120 kb 长的最小纯合缺失区内。Dammann 等^[3]利用酵母双杂交筛选方法在该区克隆出一个与鼠的 RAS 效应蛋白 Nore1 和 Max1 高度同源的 cDNA,并命名 RAS 相关区域家族 1 基因(ras-association domain family 1, RASSF1),即 RASSF1 基因。已发现 RASSF1 有 8 个外显子,RASSF1A 与肿瘤关系密切,被确认是一种候选肿瘤抑制基因。目前认为,Ras 基因不仅具有促进生长增殖的作用,同时还具有抑制增殖、促进细胞凋亡和衰老的功能。RASSF1A 的功能分析显示该蛋白在凋亡的信号传导、微管稳定性和细胞周期循环方面有潜在的作用^[4]。现已知 RASSF1A 的失活机制有:RASSF1A 启动子甲基化、纯合子缺失和杂合性丢失,以启动子甲基化为主。DNA 甲基化机制是肿瘤抑癌基因失活的重

要途径,并和异常的基因转录沉默相关^[5]。RASSF1A 基因是近来发现在肿瘤中甲基化程度最高、最多见的基因之一。

2 RASSF1A 甲基化作为肿瘤生物学标志的临床应用

对癌前病变或组织形态学仍处于正常时期病例的临床标本,利用甲基化特异性的聚合酶链反应(methylation specific polymerase chain reaction, MSP)进行甲基化检测目前已引起了极大关注^[6]。RASSF1A 甲基化能作为理想的肿瘤生物学标志有 3 个主要原因。首先,甲基化可发生于许多类型的肿瘤。第二,这些肿瘤中甲基化的频率通常是中到高度(表 1),因此能提供一个较高频度的诊断范围。第三,RASSF1A 甲基化在正常组织罕见^[7]。

2.1 作为诊断标志物

传统的恶性肿瘤诊断是建立在显微镜下肿瘤组织、细胞形态变化基础上的,组织病理学对肿瘤的描述依据是肿瘤组织和正常组织之间的可见性差异。自 2000 年起,世界卫生组织(WHO)肿瘤分类作了重大改变,组织病理学的形态学分类、分级补充一些免疫表型、遗传学特点、临床表现和影像学等综合信息来定

[基金项目] 上海市虹口区医学科研重点课题项目(No. 0702-15)。Supported by the Major Medical Research Programm of Shanghai Hongkou District(No. 0702-15)

[作者简介] 胡佳乐(1966-),男,浙江省嘉兴市人,博士,副主任医师,主要从事肿瘤治疗学方面的研究

* Corresponding author. E-mail: drhu1966@yahoo. com. cn

义^[8],这些信息要比普通的组织病理学诊断更有助于肿瘤个体化治疗。目前癌基因和抑癌基因已作为新一代的检测标志物应用于肿瘤临床诊断。肿瘤患者血浆中存在肿瘤来源的 DNA,它们来自肿瘤的血管浸润或肿瘤部位凋亡和坏死细胞的 DNA 吸收^[7]。

2.1.1 肿瘤组织标本 *RASSF1A* 表达的缺失是人类恶性肿瘤中最常见的一个分子事件,目前至少有 37 种肿瘤存在该基因的启动子甲基化^[9]。表 1 显示人类部分肿瘤 *RASSF1A* 甲基化的分析^[10]。

表 1 *RASSF1A* 甲基化在人体肿瘤组织中的发生频率

肿瘤种类	<i>RASSF1A</i> 甲基化频率 (%)
膀胱癌	62 (34/55), Lee MG, <i>et al.</i> <i>Cancer Res</i> (2001); 35 (34/98), Maruyama R, <i>et al.</i> <i>Cancer Res</i> (2001); 48 (19/40), Chan MW, <i>et al.</i> <i>Int J Cancer</i> (2003); 51 (23/45), Dulaimi E, <i>et al.</i> <i>Clin Cancer Res</i> (2004)
乳腺癌	62 (28/45), Dammann R, <i>et al.</i> <i>Oncogene</i> (2001); 49 (19/39), Burbee DG, <i>et al.</i> <i>J Natl Cancer Inst</i> (2001); 65 (11/17), Honorio S, <i>et al.</i> <i>Oncogene</i> (2003)
结直肠癌	20 (45/222), van Engeland M, <i>et al.</i> <i>Oncogene</i> (2002); 45 (13/29), Wagner KJ, <i>et al.</i> <i>Oncogene</i> (2002); 16 (24/149), Lee S, <i>et al.</i> <i>Lab Invest</i> (2004)
肾癌	91 (39/43), Dreijerink K, <i>et al.</i> <i>Proc Natl Acad Sci USA</i> (2001); 26 (44/165), Morrissey C, <i>et al.</i> <i>Cancer Res</i> (2001); 46 (23/50), Dulaimi E, <i>et al.</i> <i>Clin Cancer Res</i> (2004)
小细胞肺癌	72 (21/29), Agathangelou A, <i>et al.</i> <i>Oncogene</i> (2001); 79 (22/28), Dammann R, <i>et al.</i> <i>Oncogene</i> (2001); 84 (36/43), Toyooka S, <i>et al.</i> <i>Mol Cancer Ther</i> (2001)
非小细胞肺癌	34 (14/41), Agathangelou A, <i>et al.</i> <i>Oncogene</i> (2001); 30 (32/107), Burbee DG, <i>et al.</i> <i>J Natl Cancer Inst</i> (2001); 32 (35/110), Tomizawa Y, <i>et al.</i> <i>Clin Cancer Res</i> (2002)
前列腺癌	54 (53/101), Maruyama R, <i>et al.</i> <i>Clin Cancer Res</i> (2002); 71 (37/52), Liu LM, <i>et al.</i> <i>Oncogene</i> (2002); 99 (117/118), Jeronimo C, <i>et al.</i> <i>Clin Cancer Res</i> (2004)

2.1.2 体液

(1) 外周血

血液循环 DNA 取材较实体肿瘤容易。Müller 研究小组^[11]在过去的 5 年里对癌症患者(122 例乳腺癌)的血清标本 DNA 甲基化进行了评估,需满足下列标准之一:(1)健康对照组血清标本没有甲基化而原发性乳腺癌患者血清标本中有 >10% 的甲基化。(2)健康对照组血清样本 ≤10% 的甲基化,而原发性乳腺癌患者血清标本 >20% 的甲基化。结果显示 *APC* 基因和 *RASSF1A* 基因是乳腺癌较好的预后标志物。

卵巢癌因其发病隐匿,不易早期诊断。循环肿瘤 DNA 概念的提出,为检测卵巢癌患者血液中肿瘤相关基因的改变开辟了新的途径。马琳等^[12]报道正常健康人和卵巢良性肿瘤患者血液循环 DNA *RASSF1A* 基因甲基化的发生率均为 0; 51 例卵巢癌患者血液循环肿瘤 *RASSF1A* 甲基化的发生率为 43.1%。Caceres 等^[13]对卵巢癌患者术前血清、腹水中 *RASSF1A* 基因高甲基化进行了检测,*RASSF1A* 甲基化达 68%,而同时

检测 6 种基因 (*RASSF1A*, *BRCA1*, *APC*, *DAPK1*, *p14ARF* 和 *p16INK4A*) 可得 100% 的诊断率,高于单一基因检测;更为重要的是当血清学标记 CA-125 水平低时所检患者血清和腹腔渗出液有 88% 能检测到甲基化。一些研究还证实循环血 *RASSF1A* 甲基化在肝癌^[14]、肺癌^[15]等许多肿瘤的诊断中均有一定的价值,是一个有效的分子诊断标志物。

(2) 尿液和前列腺液

Cairns^[16]对 50 例肾癌患者术前尿液 6 个抑癌基因 *VHL*, *p16/CDKN2a*, *p14ARF*, *APC*, *RASSF1A* 和 *TIMP-3* 进行检测,44/50 例患者有高甲基化(88% 的敏感性),而正常对照和良性病变组无 1 例高甲基化,认为启动子高甲基化是肾肿瘤形成的常见和早期事件,可推广在所有肾癌患者的尿液进行检测。Dulaimi 等^[17]对 45 例膀胱癌患者术前尿液 *APC*, *RASSF1A* 和 *p14ARF* 进行检测,发现 3 种基因中至少有 1 种是阳性,高甲基化的敏感性是 87% (39/45),其中有 6 例细胞学检查是阴性,而正常尿路上皮、健康人及膀胱囊性

病变的尿液没有该 3 种基因的甲基化检出。Yates 等^[18]的尿液分析显示尿路上皮癌 *RASSF1A* 和 *APC* 为高甲基化,而对照组为低甲基化,甲基化的频率和程度随年龄和恶性度而增长。因此可以认为 MSP 是一种无创伤性早期检测膀胱癌的方法。此外,乳腺癌患者血浆中 *RASSF1A* 和 *RARBeta2* 基因甲基化水平的增高同时可在该患者的尿液中检测到^[19]。

许多前列腺癌患者需多次活检才能确诊前列腺癌。Rouprêt 等^[20]对 95 例已确诊前列腺癌欲行根治性前列腺切除术的患者和 38 例对照组患者的前列腺液用定量甲基化 PCR 的方法检测一组 10 个基因 (*GSTP1*, *RASSF1A*, *ECDH1*, *APC*, *DAPK*, *MGMT*, *p14*, *p16*, *RARBeta2* 和 *TIMP3*),结果甲基化的频率从 6.3% (*p14*)到 83.2% (*GSTP1*),有 4 个基因的甲基化能较好地地区分良、恶性病变,它们是 *GSTP1*, *RASSF1A*, *RARBeta2* 和 *APC*,敏感性和准确性分别达 86% 和 89%。因此,该 4 种基因的检测可区分患前列腺癌的高危和低危组,以决定是否需重复前列腺活检术。但其他一些研究认为 *RASSF1A* 基因高甲基化在肾、膀胱、前列腺癌的诊断作用还不够肯定,甚至价值不大^[21]。目前有必要扩大临床病例,并结合有效的血清学及免疫组织化学标志物作进一步对比研究。

(3) 痰液

许多研究提示 *RASSF1A* 甲基化对肺癌的早期检测是一个良好的标志物。Shivapurkar 等^[22]对非小细胞性肺癌 (non-small cell lung cancer, NSCLC) 及癌周肺组织,肿瘤及非肿瘤的痰液等标本进行了 11 个基因 (*3-OST-2*, *RASSF1A*, *DcR1*, *DcR2*, *p16*, *DAPK*, *APC*, *ECAD*, *HCAD*, *SOCS1*, *SOCS3*) 启动子序列甲基化的检测,其中高甲基化的基因 *3-OST-2* 为第一,*RASSF1A* 居第二,但 *RASSF1A* 甲基化水平在进展期肿瘤尤高,因此定量分析 *3-OST-2* 和 *RASSF1A* 的甲基化对 NSCLC 是一个有前途的生物学指标。Zöchbauer-Müller 等^[23]分析了 4 种不同的标本(口咽刷片、痰、支气管刷片和支气管灌洗液) *RARBeta-2*, *CDH13*, *p16*, *RASSF1A* 基因的甲基化情况,结果重度抽烟者虽无癌的证据,但痰中有形态学不典型的依据;48% 的吸烟者至少有 1 种基因的甲基化,而以痰和支气管镜刷洗液的检出率高,因此可作为肺癌危险度判断的一个参考指标。

(4) 胸腹水及其他体液

Benlloch 等^[24]对一组 87 例患者的胸水,经细胞学和组织学确诊恶性组 53 例,良性组 34 例,检测了 4 个基因的甲基化,它们是 *DAPK*, *RASSF1A*, *RARBeta* 和 *p16/INK4a*。结果显示有恶性胸水患者血清中 45.3% 检测到甲基化,良性检测率为 0%;恶性胸水中 58.5% 检出率,而良性胸水为 0%。MSP 的敏感性高于单纯

细胞学检测 (39.1%; $P=0.001$),当两者联合使用时敏感性增至 69.8% ($P=0.001$),而且可避免其他创伤性检查,对怀疑恶性胸水患者能作出迅速和可靠的诊断。

Chang 等^[25]对鼻咽癌患者口、喉漱洗液中 *p15*, *p16*, *RASSF1A*, *E-cadherin* 和 *DAPK* 等的检测,*RASSF1A* 甲基化的检出率为 67%,表明它作为鼻咽癌非创伤性检查或治疗后是否有残留癌存在的检测具有潜在的应用价值。应用阴道分泌物对 *CDH13*, *HSPA2*, *MLH1*, *RASSF1A* 和 *SOCS2* 等 5 种基因检测子宫内膜癌的危险,结果子宫内膜癌至少有 3 种或以上的基因甲基化,而无内膜癌患者 91% (99/109) 没有或低于 3 个基因的甲基化,因此这项检查对无症状妇女是否存在子宫内膜癌的风险提供了一个前瞻性的临床指标^[26]。Krassenstein 等^[27]对一组 22 例配对的肿瘤组织、正常组织和乳腺癌的乳头分泌物 *GSTP1*, *RARBeta2*, *p16/INK4a*, *p14/ARF*, *RASSF1A* 和 *DAPK* 进行检测,结果所有肿瘤存在一或多个基因的甲基化,乳腺癌 82% (18/22) 乳头分泌物中有高甲基化的 DNA,而正常乳腺、乳腺良性病变和健康妇女乳房的乳头分泌物则为阴性,乳头分泌物 DNA 甲基化检查提供了一项无创伤性的检测手段。

2.2 作为恶变危险因素的监测

细胞转化过程中的甲基化现象早于明显的恶性表型出现,甲基化研究可以为肿瘤的早期诊断提供生物学标记^[28]。因此运用 *RASSF1A* 甲基化检测良性增生性病来预测癌变的危险度。*RASSF1A* 甲基化在乳腺上皮增生、乳头状瘤及原位导管癌中常见,但正常乳腺组织为阴性,表明在良性乳腺上皮发生乳腺癌的风险上,*RASSF1A* 甲基化是一个流行病学的指标。特别需注意的是对于既往有乳腺良性病变史的活检标本在统计学上更易发生 *RASSF1A* 甲基化^[29]。19% ~ 28% 的良性前列腺增生 (benign prostatic hyperplasia, BPH) 标本显示存在甲基化^[30],有的高达 100%^[31],可用于前列腺癌的早期预测。癌前性的肠型化生用于预测胃癌的危险度,它们中显示 *RASSF1A* 甲基化^[32]。因此,良性增生性病 *RASSF1A* 甲基化的出现往往提示罹患某类型癌的危险性增高,这是可监控的最早期的阶段,提示临床上对这类病变应加强随访。

2.3 作为肿瘤预后判断的指标

随着对甲基化与肿瘤发展相关性研究的不断深入,已注意到某些恶性肿瘤 *RASSF1A* 甲基化与患者预后不良相关联。Burbee 等^[33]发现有 *RASSF1A* 甲基化的 NSCLC 患者中位生存期 (37 个月) 短于没有 *RASSF1A* 甲基化者 (52 个月)。在肺腺癌,有 *RASSF1A* 甲基化者明显地血管浸润、胸膜累及、肿瘤分化差、生

存期短^[34]。另一组 119 例 NSCLC 的研究, *p16INK4A* 甲基化出现在肺癌较早期的临床 I / II 期; *RASSF1A* 甲基化则在 NSCLC 的临床 III A 即进展期发生, 而临床 III A 期的肿瘤有 *p16INK4A* 和 *RASSF1A* 甲基化者预后极差, 不管患者是否接受了辅助化疗, *p16INK4A* 和 *RASSF1A* 甲基化都可以作为有价值的预后标志物^[35]。另有报道 *RASSF1A* 甲基化与肺癌的早期复发有关联^[36], 但也有研究不支持该结论^[37]。*RASSF1A* 甲基化在肺癌中的预后价值, 与肿瘤的分级、分期、组织类型的关系需扩大研究病例以进一步了解。

前列腺癌高 Gleason 评分或血清前列腺抗原高水平者(两者为预后差和进展期前列腺癌的特点)显示高频率的 *RASSF1A* 甲基化; 有些研究也显示 *GSTP1*、*APC* 和 *PTGS2* 基因在前列腺癌的高甲基化更有益于预后判断, 而 *RASSF1A* 甲基化仅在晚期出现^[31]。一组尿路上皮癌的研究(116 例膀胱和 164 例输尿管)中发现, *RASSF1A* 甲基化高频率明显地出现在低分化和进展期肿瘤组^[38], 其死亡率也高。乳腺癌患者血清甲基化的 *RASSF1A* 和 *APC* DNA 与转移、肿瘤大小及死亡的高危险性密切相关^[39], 两者皆表达者预后差于单一表达者。许多研究已显示, *RASSF1A* 甲基化明显高频率地出现在高级别、晚期或浸润性或转移的肿瘤, 这一现象已在许多类型肿瘤包括唾液腺腺样囊腺癌、神经胶质瘤、垂体腺瘤、胰腺内分泌肿瘤、胃癌和恶性黑色素瘤等中显示^[7]。显然, *RASSF1A* 甲基化可以为临床上的病情监控和风险评估提供依据。

2.4 作为肿瘤耐药性的观察指标

有研究表明 DNA 甲基化的分析可作为判断疗效的依据, 因此可用于肿瘤治疗计划的制定。非精原细胞瘤性生殖细胞肿瘤(non-seminomatous germ cell tumor, NSGCT)对顺铂的化疗是非常敏感的, 然而有 20% ~ 30% 的转移性肿瘤对这种治疗具有抵抗性。最近 Koul 等^[40]报道了 *RASSF1A* 启动子区的高甲基化是机体对顺铂耐药的重要因素。他们在 60 例非精原生殖细胞瘤患者的研究中发现 59% 发生启动子区的甲基化, 同时研究发现 *RASSF1A* 基因的甲基化者当中 52% 对顺铂耐受, 但 28% 敏感, 也就是说 *RASSF1A* 基因甲基化可能是对顺铂耐受的基因型; 同时也显示 NSGCT 中顺铂抵抗者较顺铂敏感者有较高的 *RASSF1A* 和 *HIC1* 甲基化, 而且 *RASSF1A* 和 *HIC1* 甲基化的频率在顺铂化疗后是增加的^[40]。最近乳腺癌患者血清 *RASSF1A* 甲基化被用于监控对三苯氧胺辅助治疗反应的一个标志^[41], 手术后及整个治疗期间该甲基化的持续存在显示对三苯氧胺治疗的抵抗, 而甲基化缺乏表明对该药有反应性。因此 *RASSF1A* 甲基化提供了顺铂和三苯氧胺治疗是否耐药的一个标志, 并可在癌

症患者整个治疗过程给予监控。

3 结 语

病理组织学的诊断通常需获得手术或活检标本。为早期发现和筛选肿瘤, 有创检查对于那些不能耐受手术检查, 或者不具备相应检查条件的患者有时不适用。甲基化检查是一种无创伤、快速、廉价的方法, 能从患者较易获取的体液标本中检测到。选择对某些肿瘤的诊断、预后判断有价值的基因谱组合是重要的。*RASSF1A* 抑癌基因在正常组织中 100% 表达, 但在大多数肿瘤中出现了较高的表达缺失, 因此 *RASSF1A* 应列入这类基因中。此外还发现该基因再表达对肿瘤生长有抑制作用, 这为人类肿瘤分子靶向治疗提供了新方向。随着 *RASSF1A* 研究的不断深入, 必将在肿瘤的早期诊断、监测高危人群、判断肿瘤预后及其他领域得到更加广泛的应用。

[参 考 文 献]

- [1] Dammann R, Schagdarsurengin U, Seidel C, et al. The tumor suppressor *RASSF1A* in human carcinogenesis: an update[J]. *Histol Histopathol*, 2005, 20(2): 645-663.
- [2] Sekido Y, Ahmadian M, Wistuba II, et al. Cloning of a breast cancer homozygous deletion junction narrows the region of search for a 3p21. 3 tumor suppressor gene[J]. *Oncogene*, 1998, 16(24): 3151-3157.
- [3] Dammann R, Li C, Yoon JH, et al. Epigenetic inactivation of a RAS association domain family protein from the lung tumour suppressor locus 3p21. 3[J]. *Nat Genet*, 2000, 25(3): 315-319.
- [4] Pfeifer GP, Dammann R. Methylation of the tumor suppressor gene *RASSF1A* in human tumors[J]. *Biochemistry (Mosc)*, 2005, 70(5): 576-583.
- [5] Baylin SB, Herman JG. DNA hypermethylation in tumorigenesis: epigenetics joins genetics[J]. *Trends Genet*, 2000, 16(4): 168-174.
- [6] Herman JG, Graff JR, Myöhänen S, et al. Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93(18): 9821-9826.
- [7] Hesson LB, Cooper WN, Latif F. The role of *RASSF1A* methylation in cancer[J]. *Dis Markers*, 2007, 23(1-2): 73-87.
- [8] 朱雄贻. 评 WHO 肿瘤分类新系列[J]. *中国癌症杂志*, 2001, 11(5): 393-395.
- [9] van der Weyden L, Adams DJ. The Ras-association domain family (*RASSF*) members and their role in human tumorigenesis[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2007, 1776(1): 58-85.
- [10] Xing M. Gene methylation in thyroid tumorigenesis[J]. *Endocrinology*, 2007, 148(3): 948-953.
- [11] Müller HM, Fiegl H, Widschwendter A, et al. Prognostic DNA methylation marker in serum of cancer patients[J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2004, 1022: 44-49.
- [12] 马琳, 刘芙蓉, 张淑兰. 卵巢癌患者血液 *RASSF1A* 基因甲基化的检测及其意义[J]. *中华病理学杂志*, 2005, 34(12):

- 785-787.
- [13] Ibanez de Caceres I, Battagli C, Esteller M, *et al.* Tumor cell-specific BRCA1 and RASSF1A hypermethylation in serum, plasma, and peritoneal fluid from ovarian cancer patients[J]. *Cancer Res*, 2004, 64(18): 6476-6481.
- [14] Zhang YJ, Wu HC, Shen J, *et al.* Predicting hepatocellular carcinoma by detection of aberrant promoter methylation in serum DNA [J]. *Clin Cancer Res*, 2007, 13(8): 2378-2384.
- [15] Wang Y, Yu Z, Wang T, *et al.* Identification of epigenetic aberrant promoter methylation of RASSF1A in serum DNA and its clinicopathological significance in lung cancer [J]. *Lung Cancer*, 2007, 56(2): 289-294.
- [16] Cairns P. Detection of promoter hypermethylation of tumor suppressor genes in urine from kidney cancer patients[J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2004, 1022: 40-43.
- [17] Dulaimi E, Uzzo RG, Greenberg RE, *et al.* Detection of bladder cancer in urine by a tumor suppressor gene hypermethylation panel [J]. *Clin Cancer Res*, 2004, 1(6): 1887-1893.
- [18] Yates DR, Rehman I, Meuth M, *et al.* Methylation analysis: a prospective study of bladder cancer patients and age stratified benign controls[J]. *Oncogene*, 2006, 25(15): 1984-1988.
- [19] Bryzgunova OE, Skvortsova TE, Kolesnikova EV, *et al.* Isolation and comparative study of cell-free nucleic acids from human urine [J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2006, 1075: 334-340.
- [20] Rouprêt M, Hupertan V, Yates DR, *et al.* Molecular detection of localized prostate cancer using quantitative methylation-specific PCR on urinary cells obtained following prostate massage[J]. *Clin Cancer Res*, 2007, 13(6): 1720-1725.
- [21] Friedrich MG, Weisenberger DJ, Cheng JC, *et al.* Detection of methylated apoptosis-associated genes in urine sediments of bladder cancer patients[J]. *Clin Cancer Res*, 2004, 10(22): 7457-7465.
- [22] Shivapurkar N, Stastny V, Suzuki M, *et al.* Application of a methylation gene panel by quantitative PCR for lung cancers[J]. *Cancer Lett*, 2007, 247(1): 56-71.
- [23] Zöchbauer-Müller S, Lam S, Toyooka S, *et al.* Aberrant methylation of multiple genes in the upper aerodigestive tract epithelium of heavy smokers[J]. *Int J Cancer*, 2003, 107(4): 612-616.
- [24] Benloch S, Galbis-Caravajal JM, Martín C, *et al.* Potential diagnostic value of methylation profile in pleural fluid and serum from cancer patients with pleural effusion[J]. *Cancer*, 2006, 107(8): 1859-1865.
- [25] Chang HW, Chan A, Kwong DL, *et al.* Evaluation of hypermethylated tumor suppressor genes as tumor markers in mouth and throat rinsing fluid, nasopharyngeal swab and peripheral blood of nasopharyngeal carcinoma patient[J]. *Int J Cancer*, 2003, 105(6): 851-855.
- [26] Fiegl H, Gatttringer C, Widschwendter A, *et al.* Methylated DNA collected by tampons--a new tool to detect endometrial cancer[J]. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2004, 13(5): 882-888.
- [27] Krassenstein R, Sauter E, Dulaimi E, *et al.* Detection of breast cancer in nipple aspirate fluid by CpG island hypermethylation[J]. *Clin Cancer Res*, 2004, 10(1pt1): 28-32.
- [28] 董 晖, 钟 丽, 孙兴旺. 肿瘤 DNA 甲基化的临床应用进展 [J]. *实用癌症杂志*, 2007, 22(5): 527-528.
- [29] Lewis CM, Cler LR, Bu DW, *et al.* Promoter hypermethylation in benign breast epithelium in relation to predicted breast cancer risk [J]. *Clin Cancer Res*, 2005, 11(1): 166-172.
- [30] Bastian PJ, Ellinger J, Wellmann A, *et al.* Diagnostic and prognostic information in prostate cancer with the help of a small set of hypermethylated gene loci[J]. *Clin Cancer Res*, 2005, 11(11): 4097-4106.
- [31] Jerónimo C, Henrique R, Hoque MO, *et al.* A quantitative promoter methylation profile of prostate cancer [J]. *Clin Cancer Res*, 2004, 10(24): 8472-8478.
- [32] To KF, Leung WK, Lee TL, *et al.* Promoter hypermethylation of tumor-related genes in gastric intestinal metaplasia of patients with and without gastric cancer[J]. *Int J Cancer*, 2002, 102(6): 623-628.
- [33] Burbee DG, Forgacs E, Zöchbauer-Müller S, *et al.* Epigenetic inactivation of RASSF1A in lung and breast cancers and malignant phenotype suppression[J]. *J Natl Cancer Inst*, 2001, 93(9): 691-699.
- [34] Tomizawa Y, Kohno T, Kondo H, *et al.* Clinicopathological significance of epigenetic inactivation of RASSF1A at 3p21.3 in stage I lung adenocarcinoma[J]. *Clin Cancer Res*, 2002, 8(7): 2362-2368.
- [35] Wang J, Lee JJ, Wang L, *et al.* Value of p16(INK4a) and RASSF1A promoter hypermethylation in prognosis of patients with resectable non-small cell lung cancer[J]. *Clin Cancer Res*, 2004, 10(18pt1): 6119-6125.
- [36] Endoh H, Yatabe Y, Shimizu S, *et al.* RASSF1A gene inactivation in non-small cell lung cancer and its clinical implication [J]. *Int J Cancer*, 2003, 106(1): 45-51.
- [37] Choi N, Son DS, Song I, *et al.* RASSF1A is not appropriate as an early detection marker or a prognostic marker for non-small cell lung cancer [J]. *Int J Cancer*, 2005, 115(4): 575-581.
- [38] Catto JW, Azzouzi AR, Rehman I, *et al.* Promoter hypermethylation is associated with tumor location, stage, and subsequent progression in transitional cell carcinoma [J]. *J Clin Oncol*, 2005, 23(13): 2903-2910.
- [39] Müller HM, Widschwendter A, Fiegl H, *et al.* DNA methylation in serum of breast cancer patients: an independent prognostic marker[J]. *Cancer Res*, 2003, 63(22): 7641-7645.
- [40] Koul S, McKiernan J. M, Narayan G, *et al.* Role of promoter hypermethylation in cisplatin treatment response of male germ cell tumors[J]. *Mol Cancer*, 2004, 3: 16-27.
- [41] Fiegl H, Millinger S, Mueller-Holzner E, *et al.* Circulating tumor-specific DNA: a marker for monitoring efficacy of adjuvant therapy in cancer patients[J]. *Cancer Res*, 2005, 65(4): 1141-1145.

[收稿日期] 2008 - 02 - 28

[修回日期] 2008 - 04 - 15

[本文编辑] 郁晓路